

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO EMPREGADAS**  
**NA ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS**

**RAFAEL CHOZE**

Florianópolis, novembro de 2004.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO EMPREGADAS**  
**NA ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS**

*Trabalho de conclusão no Curso de Química*  
*do Centro de Ciências Física e Matemáticas*  
*da Universidade Federal de Santa Catarina*

*Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti*

**RAFAEL CHOZE**

Florianópolis, novembro de 2004.

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, em especial ao nosso poeta na arte de isolar e identificar substâncias isoladas de produtos naturais de plantas, professor Moacir Geraldo Pizzolatti, que me ofereceu a oportunidade de aprendizado na área de produtos naturais, aos meus colegas de laboratório e de sala de aula que tiveram a bondade e paciência de conviver e passar alguma experiência relevante a mim, a minha família, em especial a minha mãe e aos olhos verdes repletos de esplendor que iluminaram cada milésimo de segundo de minha vida. Com muita luta e a certeza de uma evolução científica aprendida dedico este trabalho a todos vocês.

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	09
<b>2. OBJETIVOS</b>	11
<b>3. METODOLOGIAS EMPREGADAS NO ESTUDO DE PLANTAS MEDICINAIS</b>	12
<b>3.1. COLETA DA AMOSTRA</b>	12
<b>3.2. ESTABILIZAÇÃO E SECAGEM</b>	12
<b>3.3. OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS</b>	13
<b>3.4. FRACIONAMENTO DE EXTRATOS VEGETAIS</b>	15
<b>3.5. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA</b>	20
<b>3.6. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO</b>	24
<b>3.7. ANÁLISE ESTRUTURAL</b>	24
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b>	27
<b>4.1. MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
<b>4.2. METODOLOGIA</b>	28
<b>4.3. MONITORAMENTO DAS FRAÇÕES CLOROFÓRMIO</b>	28
<b>4.4. PROCEDIMENTOS REALIZADOS NA FRAÇÃO AQUOSA DA <i>POLYGALA SP</i></b>	30
<b>4.5. FLUXOGRAMA</b>	32
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	33
<b>5.1. IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO PS<sub>1</sub></b>	33
<b>5.2. IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO PS<sub>2</sub></b>	34
<b>5.3. IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO AQ<sub>3</sub></b>	35
<b>5.4. IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO AQ<sub>4</sub></b>	36
<b>6. CONCLUSÃO</b>	38
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	39

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
Tabela 1: Solventes mais utilizados e os respectivos grupos de metabólicos majoritariamente encontrados nos diferentes extratos.	14
Tabela 2: Reativos para cromatografia em camada delgada.	22
Tabela 3: Sistema de eluição utilizado no fracionamento das frações reunidas da fase clorofórmio.	29
Tabela 4: Reunião das frações obtidas na coluna do extrato clorofórmio.	29
Tabela 5: Sistema de eluição utilizado no fracionamento da fração aquosa.	31
Tabela 6: Reunião das frações obtidas na coluna do extrato aquoso.	31

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1: Cromatografia em coluna	18
Figura 2: Fluxograma mostrando o fracionamento dos extratos da <i>Polygala sp.</i>	32
Figura 3: Estrutura do composto PS <sub>1</sub> (dihidroestirilpirona).	33
Figura 4: Estrutura do composto PS <sub>2</sub> (escopoletina).	34
Figura 5: Estrutura do composto Aq <sub>3</sub> (rutina).	36
Figura 6: CCD do composto isolado e padrão de rutina.	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
IV	Infravermelho
Rf	Índice de retenção
KBr	Brometo de Potássio
MHz	Megahertz
UV	Ultravioleta
RMN $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
CG	Cromatografia Gasosa
RMN $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

## RESUMO

### TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO EMPREGADAS NA ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS

Autor: Rafael Choze

Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Embora alguns fármacos sejam resultado de descobertas fortuitas, a maior parte deles advém de programas de triagem de pesquisas minuciosamente elaboradas, de modificação molecular. A partir do isolamento e identificação estrutural dos princípios vegetais ativos, os químicos orgânicos podem recriá-los por síntese total no laboratório ou, mais importante utilizando a substância de partida para a criação de estruturas químicas ligeiramente diferentes. As novas estruturas podem ter atividade farmacológica pouco ou muito diferente da substância de origem, dependendo da natureza e da extensão da alteração química.

Neste trabalho procurou-se descrever as técnicas empregadas na análise de produtos naturais, tais como cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna, cromatografia gasosa, recristalização e ressaltar sua importância, bem como descrever o procedimento de obtenção do extrato vegetal bruto de *Polygala sp* e sua posterior separação em frações.

Em laboratório, utilizando-se como modelo extratos de *Polygala sp*, buscou-se isolar alguns compostos, submetendo a fracionamentos por cromatografia de sílica-gel, utilizando-se como eluentes hexano/acetato de etila e hexano/acetato de etila/etanol em gradiente de polaridade. A identificação foi feita por meio de técnicas espectroscópicas, tais como infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

Obteve-se o isolamento de quatro compostos: escopoletina, estirilpirona, rutina e um poliol sendo os dois primeiros isolados da fração clorofórmio e os seguintes da fração aquosa.



## 1. INTRODUÇÃO

A pesquisa fitoquímica tem por importância e objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas<sup>1</sup>.

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Um importante aspecto é que os produtos encontrados na natureza relevam uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e propriedades biológicas<sup>1</sup>.

Embora alguns compostos isolados de extratos de plantas possuam uma atividade biológica, estes compostos podem não possuir todas as características desejadas – elevada potencialidade, uma melhor velocidade e extensão de absorção, solubilidade, baixo teor de toxicidade, transformar em vantagem o tempo em que permanece no organismo e assim por diante. Assim, a substância química medicinal pode visar a modificação da estrutura básica do composto, de modo a melhorar as características desejadas, ao mesmo tempo em que reduz as indesejáveis. Estas modificações químicas produzem análogos que têm grupos químicos funcionais diferentes ou adicionais, estruturas de anel alteradas, ou configurações químicas diferentes. Os resultados são compostos químicos modificados, capazes de interações distintas com os receptores do organismo, tendo, portanto, ações e intensidades de ação diferentes, sendo que estas transformações auxiliam na determinação estrutural, além de ser indispensável em estudos de correlação estrutura-atividade, tornando esta ferramenta importante para o desenvolvimento de novas drogas<sup>2</sup>.

A estereoquímica, mais particularmente a configuração absoluta do composto, os arranjo espacial envolvendo a rotação das ligações sigmas covalentes, associadas a energias inferiores a 10kcal/mol, caracterizando as conformações da molécula e a quiralidade são alguns dos aspectos de extrema relevância na atividade biológica, sendo motivo de uma

cuidadosa investigação do comportamento destes fármacos, podendo influenciar em processos de absorção, metabolismo, eliminação, etc<sup>3</sup>.

Entre os métodos modernos de análise de extratos de produtos naturais, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua versatilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise. Algumas técnicas de cromatografia são bastante empregadas nestes processos de isolamento de compostos, dentre as quais destaca-se a cromatografia em camada delgada, a cromatografia em coluna, cromatografia gasosa e cromatografia de alta eficiência. No entanto, quando se encontra um solvente adequado para a substância cristalizar, a técnica de recristalização torna-se um dos melhores métodos de purificação<sup>4</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo geral descrever as principais técnicas fitoquímicas utilizadas na separação, isolamento, identificação e quantificação dos metabólitos secundários presentes em extratos vegetais.

Como objetivo específico, utilizou-se como modelo extratos de *Polygala sp*, para o isolamento e caracterização de seus compostos majoritários, fazendo uso de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

### **3. METODOLOGIAS EMPREGADAS NO ESTUDO DE PLANTAS MEDICINAIS**

#### **3.1. COLETA DA AMOSTRA**

A primeira etapa no estudo de uma determinada espécie vegetal seja sob a ótica da fitoquímica clássica seja para o estudo de suas atividades é a coleta e identificação do material vegetal. É essencial que se prepare uma exsicata para a identificação botânica e que a seleção do material coletado seja feita com cuidado, evitando coletar partes do vegetal afetadas por doenças, parasitas e também materiais estranhos, tais como outras plantas ou mesmo partes da própria planta que não sejam de interesse para a investigação. Deve-se registrar o local, a hora e a data da coleta, já que o meio ambiente, a hora do dia e a época do ano exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo dos metabólitos vegetais, quando estes são sensíveis a variações sazonais<sup>1</sup>.

#### **3.2. ESTABILIZAÇÃO E SECAGEM**

No caso de execução da análise fitoquímica em tempo distante da coleta, o material vegetal deve ser imediatamente tratado, de forma a impedir a ação enzimática e, assim, evitar a alteração dos compostos químicos originalmente presentes no vegetal. Esse objetivo é alcançado pela estabilização, que consiste na desnaturação protéica das enzimas celulares utilizando agentes desidratantes, tais como o etanol, ou por ação do calor<sup>1</sup>.

A secagem é o tipo de tratamento mais comum e seu objetivo é eliminar certa quantidade de água do órgão vegetal. Esse tipo de tratamento, além de diminuir o volume do material, facilita a conservação. O teor de água no material vegetal é muito importante para sua conservação. Quanto maior este fator, mais sujeita a agentes deletérios o material fica. Porcentagens elevadas de água facilitam o ataque dos princípios ativos por fungos, bactérias e enzimas<sup>5</sup>.

A secagem pode ser realizada ao ar livre ou com a utilização de ar quente, em estufas apropriadas, mantendo a temperatura constante durante o tempo desejado. A operação de secagem, independente de como é feita, propicia a redução de volume e de

peso e facilita a moagem dos materiais. A moagem tem por finalidade reduzir, mecanicamente, o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões aumentando com isto a eficiência da extração<sup>1</sup>.

### 3.3. OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS

Antes de executar uma extração, deve-se levar em consideração uma série de fatores que interferem nesta operação, tais como as características do material vegetal, o seu grau de divisão, o meio extrator (solvente) e a metodologia<sup>1</sup>.

A estrutura histológica das diversas partes componentes de uma planta é bastante heterogênea; existem órgãos, como as raízes e os caules, cujos tecidos estão extraordinariamente compactados (xilema), ao passo que em flores e folhas os tecidos se apresentam com textura mais delicada. Como o poder de penetração dos solventes depende, entre outros fatores, da consistência dos tecidos que formam o material a extrair, é necessário considerar que quanto mais rígido for o material menor deve ser sua granulometria<sup>1</sup>.

O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível. É graças à seletividade e por conseqüência a polaridade do solvente que se pode extrair apenas as substâncias desejadas ou em maior quantidade. Em análises fitoquímicas, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se, assim, uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridade também crescente. Seguem alguns exemplos dos solventes, em ordem crescente de polaridade, mais utilizada e os respectivos grupos de metabólitos majoritariamente encontrados nos diferentes extratos<sup>1</sup>, sendo constados na Tabela 1.

Tabela 1: Solventes mais utilizados e os respectivos grupos de metabólitos majoritariamente encontrados nos diferentes extratos.

<b>Solvente</b>	<b>Tipos de substâncias preferencialmente extraídas</b>
Éter de petróleo, hexano	Lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas
Tolueno, diclorometano, clorofórmio	Bases livres de alcalóides, antraquinonas livres, óleos voláteis
Acetato de etila, n-butanol	Flavonóides, cumarinas simples
Etanol, metanol	Heterosídeos em geral
Misturas hidroalcoólicas, água	Saponinas, taninos
Água acidificada	Alcalóides
Água alcalinizada	Saponinas

O aumento da temperatura provoca um aumento da solubilidade de qualquer substância, motivo pelo qual os métodos de extração a quente são sempre mais rápidos do que aqueles realizados à temperatura ambiente. Entretanto, o calor nem sempre pode ser empregado, já que muitas substâncias são instáveis a partir de 70°C<sup>6</sup>.

Como a composição química das plantas é extremamente complexa, muito freqüentemente ocorre a extração concomitante de vários tipos de substâncias, farmacologicamente ativas ou não, desejadas ou não, por isso o método e o solvente extrator devem ser levados em consideração<sup>7</sup>.

### 3.3.1. Procedimentos de Extração

Dentre os métodos de extração de extratos vegetais destacam-se a percolação, a maceração, a decocção, extração em aparelho de Soxhlet e a destilação por arraste<sup>6</sup>.

A percolação é um processo no qual determinado solvente flui através de uma matriz sólida. Na percolação, a droga vegetal moída é colocada em um recipiente cônico ou cilindro (percolador), de vidro ou de metal, através do qual é feito passar o líquido extrator<sup>1</sup>.

Outro tipo de extração é a decocção que consiste em manter o material vegetal em contato, durante certo tempo, com um solvente (normalmente água) em ebulição. É uma

técnica de emprego restrito, pois muitas substâncias ativas são alteradas por aquecimento prolongado e costuma-se empregá-la com materiais vegetais duros e de natureza lenhosa<sup>1</sup>.

A extração em aparelho de Soxhlet é uma técnica que é utilizada para extrair substâncias com solventes voláteis e em cada ciclo da operação, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado; assim, o processo possibilita uma extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida de solvente, em comparação com as quantidades necessárias nos outros processos extrativos, para se obter melhores resultados qualitativos e quantitativos<sup>1</sup>.

A destilação por arraste de vapor é utilizada na obtenção de óleos essenciais, pois muitos componentes dos óleos essenciais são substâncias de baixo ponto de ebulição e podem ser isolados através desta técnica. A destilação por arraste de vapor é uma destilação de misturas imiscíveis de compostos orgânicos e água (vapor). O princípio da destilação a vapor baseia-se no fato de que a pressão total de vapor de uma mistura de líquidos imiscíveis é igual a soma da pressão de vapor dos componentes puros individuais. A pressão total de vapor da mistura torna-se igual à pressão atmosférica, e a mistura ferve numa temperatura menor que o ponto de ebulição de qualquer um dos componentes<sup>8</sup>.

A maceração é designada uma operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, durante um período prolongado (horas ou dias), sem renovação do líquido extrator. Posteriormente a retirada do extrato é realizada uma remaceração, ou seja, a operação é repetida utilizando o mesmo material vegetal, renovando-se apenas o líquido extrator<sup>1</sup>.

### 3.4. Fracionamento de Extratos Vegetais

Os processos de fracionamento de extratos vegetais com vistas ao isolamento de substâncias ativas podem ser monitorados por ensaios direcionados para a avaliação da atividade biológica<sup>6</sup>.

### 3.4.1. Pré-Fracionamento

#### 3.4.1.1. Partição com solventes orgânicos

Pode-se iniciar o particionamento de um extrato vegetal com solventes de diferentes polaridades, extraíndo seletivamente os compostos de igual polaridade (extração líquido-líquido) ou através da partição ácido-base (através de um solvente que reaja quimicamente com o composto)<sup>1</sup>.

Quando as duas fases são líquidas imiscíveis, o método é conhecido como "extração líquido-líquido". Neste tipo de extração o composto estará distribuído entre os dois solventes. O sucesso da separação depende da diferença de solubilidade do composto nos dois solventes. Geralmente, o composto a ser extraído é insolúvel ou parcialmente solúvel num solvente, mas é muito solúvel no outro solvente. A água é usada como um dos solventes na extração líquido-líquido, uma vez que a maioria dos compostos orgânicos são imiscíveis em água e porque ela dissolve compostos iônicos ou altamente polares. Os solventes mais comuns que são compatíveis com a água na extração de compostos orgânicos são: éter etílico, benzeno, clorofórmio, diclorometano e éter de petróleo. Estes solventes são relativamente insolúveis em água e formam, portanto, duas fases distintas. A seleção do solvente dependerá da solubilidade da substância a ser extraída e da facilidade com que o solvente possa ser separado do soluto<sup>8</sup>.

Para o desenvolvimento da técnica de extração ácido-base pode-se usar um solvente extrator que reaja quimicamente com o composto a ser extraído. A técnica de extração por solventes quimicamente ativos depende do uso de um reagente (solvente) que reaja com o composto em questão a ser extraído. Incluem-se, entre tais solventes: soluções aquosas de hidróxido de sódio (usado na extração de ácidos carboxílicos e fenóis), bicarbonato de sódio (usado na extração de ácidos carboxílicos fortes), ácido clorídrico (extração de alcalóides)<sup>8</sup>, etc.



### 3.4.1.2. Filtração em sílica gel

Um procedimento conseguinte para fracionarmos o extrato vegetal é utilizarmos um leito filtrante de sílica na qual esta, através da eluição com proporções de solventes adequados, separará em diversas frações o extrato vegetal e por consequência os diferentes compostos presentes<sup>7</sup>.

### 3.4.2. Fracionamento Cromatográfico

#### 3.4.2.1. Cromatografia em coluna

De uma maneira geral, a coluna cromatográfica é constituída por um tubo de vidro, em posição vertical; a extremidade inferior é afilada terminando numa torneira, que permitirá o controle da vazão da fase móvel e suas dimensões dependerão da quantidade de material a ser cromatografado<sup>4</sup>.

A fase que fica no interior da coluna (fase estacionária) é suportada, na parte inferior, por um pedaço de algodão. Dentre as fases estacionárias mais comuns destacam-se a sílica, alumina (podendo ser básica, ácida ou neutra), celulose, poliamida, etc<sup>4</sup>.

Para se conhecer a natureza do processo de adsorção deve-se considerar a atividade do adsorvente que, de uma maneira geral, traduz a força de adsorção. Assim os componentes fortemente retidos pela fase estacionária movem-se lentamente na fase móvel (fluido que percola através da fase estacionária)<sup>4</sup>.

A separação dos componentes da amostra depende da polaridade de cada componente e da fase estacionária. O processo de interação dos componentes da amostra com a fase estacionária está associado a interações intermoleculares, dentre as quais se destacam as ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações dipolo-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido instantâneo<sup>9</sup>.

A reprodutibilidade de uma coluna cromatográfica pode ser modificada utilizando um tamanho de partícula adequada (granulometria do adsorvente), sendo que não se usaria

um tamanho tão pequeno que impediria o fluxo da fase móvel<sup>9</sup>. Abaixo (Figura1) é mostrada a separação dos compostos por cromatografia em coluna.

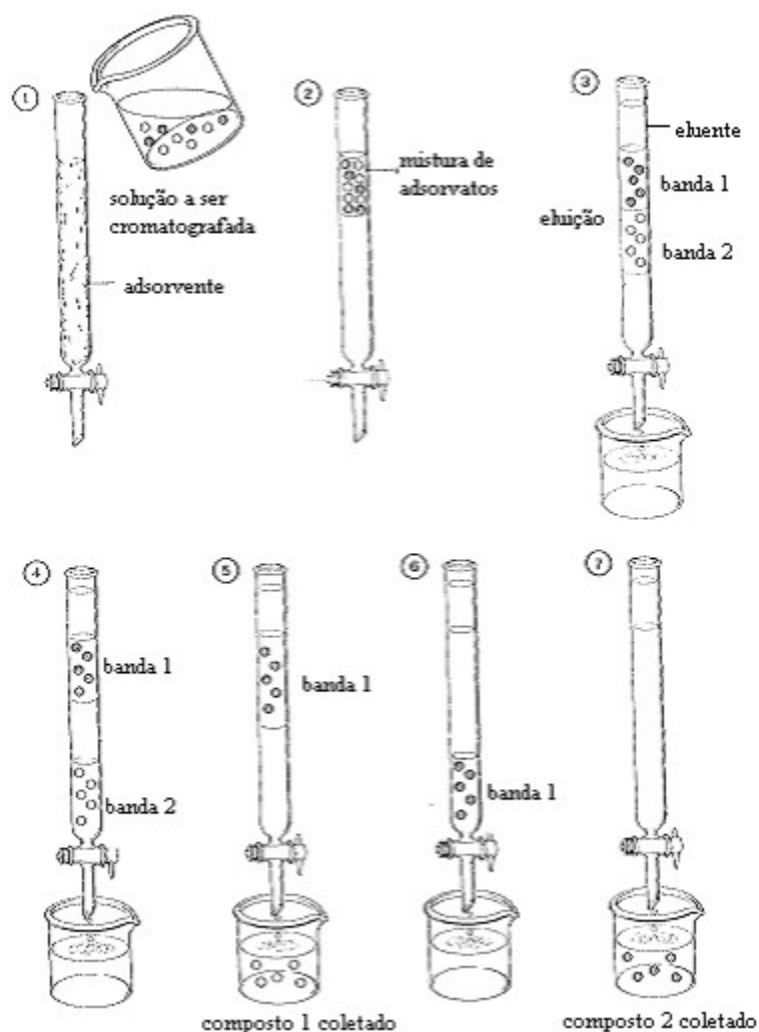


Figura 1: Cromatografia em coluna

### 3.4.2.2. Escolha de eluentes

As funções da fase móvel na cromatografia por adsorção têm sentido amplo, dentre as quais realizar a função de solvente, propriamente dito, no que deve ser levada em consideração a relação de solubilidade dos componentes da mistura a ser cromatografada. Outra função é de realizar, primordialmente, o desenvolvimento dos componentes da

mistura na coluna e remover ou desorver estes componentes do adsorvente. Neste caso, são ditos eluentes<sup>9</sup>.

Após ter sido escolhido a fase estacionária, os eluentes são selecionados de acordo com a força eluotrópica<sup>7</sup>, isto é, um aumento da habilidade de interagir com as substâncias retidas na fase estacionária. Na cromatografia de adsorção, a dessorção é facilitada quando se usa um eluente polar e dificultada pelo uso daquele de polaridade menor; isto é, um adsorvato estará mais fixado no adsorvente quando o eluente em uso é pouco polar. Porém, o deslocamento do adsorvato é lento. Para o desenvolvimento do mesmo tornar-se mais rápido deve-se usar um outro eluente mais polar. Desta maneira é conveniente desenvolver uma coluna cromatográfica na forma de um gradiente de polaridade crescente<sup>1</sup>. Esta série é mostrada abaixo em ordem crescente de polaridade<sup>7</sup>.

- Hexano, Éter de petróleo, Benzeno, Tolueno, Diclorometano, Clorofórmio, Éter etílico, Acetato de etila, Acetona, Etanol, Metanol, Ácido acético<sup>7</sup>.

Desta série de eluentes deve-se escolher aquele(s) que consegue(m) dessorver o adsorvato. A polaridade desta série gradual de eluentes está relacionada com as experiências práticas de cromatografia em coluna. A velocidade de eluição deve ser equalizada levando em conta dois processos físicos que ocorrem durante uma cromatografia, à transferência de massa e a difusão molecular. Portanto, a eluição tem que ser suficientemente lenta para que se possa manter os equilíbrios de transferência de massas e suficientemente rápida para que se evite a difusão molecular<sup>9</sup>.

### 3.4.2.3. Enchimento da coluna

Quanto mais uniforme for o enchimento da coluna, maior será a sua eficiência. Durante o enchimento o ar pode ficar retido entre as partículas, o que não é conveniente, pois formaria canais na coluna que prejudicariam as bandas em eluição. Para se evitar a retenção de ar o adsorvente deve ser agitado num frasco, com a fase móvel, até a constituição de uma pasta, a qual será então colocada dentro da coluna, já contendo 1/3 da fase móvel. Nesta operação acompanhada por vibração da coluna e, deixando o material assentar gradualmente, obtém-se uma razoável homogeneidade. Se existir uma uniformidade no tamanho das partículas, melhor será a homogeneidade do recheio. Deve-se

evitar deixar a coluna secar durante o enchimento ou durante a eluição, porque aparecem rachaduras na coluna, com o que a separação cromatográfica ficaria altamente prejudicada<sup>9</sup>.

Uma vez montada a coluna cromatográfica, a amostra deve ser aplicada ao topo da mesma. As amostras, tanto sólida ou líquida podem ser misturadas com o adsorvente e, após evaporar o solvente, a mistura é colocada no topo da coluna. Após toda amostra ter sido colocada é adicionada a fase móvel, cuidadosamente, até que se forme uma coluna líquida incolor e límpida acima do nível superior da amostra<sup>4</sup>.

#### 3.4.2.4. A eluição

Uma coluna cromatográfica pode ser fixada em qualquer posição no espaço, porém a mais conveniente é fixa-la em posição vertical. Assim a eluição se processará por ação da gravidade. A fase móvel, quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo cromatografada. A velocidade de eluição de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, isto é, quanto mais fracamente o componente for adsorvido, mais rápido é a sua passagem pela coluna, e vice-versa. Conclui-se, portanto, que quanto maior a diferença entre os coeficientes de adsorção, mais completa será a separação do composto. Esta separação dos componentes de uma mistura ocorre devido às diferenças nas forças de interação entre eles e o adsorvente<sup>4</sup>.

### 3.5. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

#### 3.5.1. Cromatografia em camada delgada

A CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção<sup>10</sup>. É utilizada com maior frequência na análise vegetal, em virtude da simplicidade, rapidez e sensibilidade oferecidas pela técnica<sup>7</sup>.

### 3.5.1.1. Preparação e ativação das placas

Existem várias formas de se preparar uma placa cromatográfica, quer manualmente quer com emprego de espalhadores. Independente do método escolhido, a preparação sempre se inicia com a limpeza da placa de vidro, procurando-se eliminar toda a gordura de sua superfície. Existem, porém placas pré-fabricadas dos adsorventes mais utilizados (como sílica), disponíveis no mercado há algum tempo. Apesar de terem um custo bem elevado, dispensam a fase de preparação e são bem mais uniformes e homogêneas o que, sem dúvida, melhora a separação e torna valores de  $R_f$  mais reprodutíveis<sup>4</sup>.

O solvente ou mistura de solventes a serem utilizados como fase móvel devem ser escolhidos cuidadosamente, pois terão papel fundamental na separação de misturas. Entende-se que existe uma competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra, pela superfície do adsorvente. Portanto, na escolha da fase móvel temos que considerar a natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade da fase móvel<sup>9</sup>.

Quando uma fase móvel pura não separa bem os componentes de uma amostra, pode-se utilizar uma mistura. Podemos ter diferentes misturas que promovam igual separação das amostras, entretanto, no geral observa-se que pequenas variações na composição da fase móvel levam a grandes alterações no deslocamento das manchas<sup>6</sup>.

### 3.5.1.2. Aplicação das amostras nas cromatoplasas e eluição

Para a aplicação da amostra podemos utilizar tubos capilares de vidro, que permitem determinar a quantidade de substância colocada na placa<sup>4</sup>.

As gotas devem ser aplicadas 1,5 a 2,0 cm acima do bordo inferior, evitando-se que fiquem mergulhadas na fase móvel quando a placa for colocada na cuba. À distância entre cada gota é de aproximadamente 1,0 cm, evitando-se sempre que haja contato entre as gotas de soluções<sup>7</sup>.

Um aspecto importante é que a amostra deve ser aplicada como uma faixa horizontal uniforme, para evitar que o solvente corra desigual e com isso termos uma melhor separação<sup>4</sup>.

### 3.5.1.3. Revelação dos cromatogramas

Após o desenvolvimento do cromatograma, as placas são secas e reveladas. Esta última etapa consiste em tornar visíveis as substâncias incolores presentes na amostra<sup>4</sup>.

Muitos compostos podem ser visualizados através de luz ultravioleta, também utiliza-se muito para compostos orgânicos a exposição da cromatoplaça aos vapores de iodo, em recipiente fechado. A grande vantagem deste método é que o iodo revela todos os compostos que possuem ligações duplas e pode ser posteriormente eliminado, na maioria dos casos, através do aquecimento da placa, a qual pode então ser borificada com outro reativo<sup>6</sup>. Vários outros reveladores são utilizados na análise cromatográfica<sup>6</sup>, sendo os mais importantes listados abaixo na Tabela 2.

Tabela 2: Reativos para cromatografia em camada delgada.

Reativos	Deteção
Anisaldeído sulfúrico	Esteróides, terpenóides, etc.
Vanilina sulfúrica	Esteróides, terpenóides, flavonóides
Sulfato de cério (IV)	Triterpenos, diterpenos, sesquiterpenos
Cloreto férrico	Fenóis e flavonóides
Cloreto de alumínio	Flavonóides
Ácido p-toluenosulfônico	Catequinas, esteróides, etc.
Tiocinonato de cobalto (II)	Alcalóides e aminas
Reagente de Dragendorff	Alcalóides
Hidróxido de potássio em 10% etanol	Cumarinas, antronas, antraquinona
Ácido sulfúrico	Reativo universal
Permanganato de potássio + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Reativo universal
Cuba de iodo	Sistema pi

#### 3.5.1.4. Índice de retenção

Um parâmetro freqüentemente usado em cromatografia é o "fator de retenção" de um composto ( $R_f$ ). Na cromatografia de camada delgada, o  $R_f$  é função do tipo de suporte (fase fixa) empregado e do eluente. Ele é definido como a razão entre a distância percorrida pela mancha do componente e a distância percorrida pelo eluente<sup>8</sup>.

Portanto:

Onde:

$$R_f = d_c / d_s$$

$d_c$  = distância percorrida pelo componentes da mistura.

$d_s$  = distância percorrida pelo eluente.

Há a necessidade de fixar circunstâncias experimentais, em virtude de vários fatores modificarem os resultados, como o adsorvente, espessura, eluentes, etc. Em condições estabilizadas, é constante a velocidade de migração de cada constituinte e assim pode-se caracterizá-los por um valor numérico ( $R_f$ )<sup>7</sup>.

#### 3.5.2. Cromatografia gasosa

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis, sendo bastante utilizada na área de produtos naturais. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado (fase móvel ou gás de arraste). Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura. As substâncias que são carregadas pelo gás de arraste interagem de forma distinta com a fase estacionária. Isto acarreta tempos de residência na coluna diferentes para diferentes compostos. Dessa forma, as substâncias chegam ao detector em tempos diferentes e, portanto, separadas. O detector gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluido. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa<sup>10</sup>.

A CG permite identificar e quantificar compostos. A identificação pode ser feita com a adição de uma substância conhecida quando se deseja confirmar a presença da mesma na amostra<sup>10</sup>.

A quantificação está fundamentada na medida da área (que é proporcional à massa do analito) do respectivo pico de cada substância. A área obtida para um determinado composto em estudo pode ser comparada proporcionalmente e quantitativamente a um padrão interno (considerando o fator resposta) ou utilizar a adição de padrão à amostra<sup>10</sup>.

### 3.6. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO

#### 3.6.1. Recristalização

Um procedimento de enorme valia na purificação de um composto é a técnica de recristalização, onde esta se baseia na diferença de solubilidade que pode existir entre um composto cristalino e as impurezas presentes no produto da reação. Um requisito é que o solvente usado na recristalização deve proporcionar uma fácil dissolução da substância a altas temperaturas e pouca solubilidade da substância a baixas temperaturas<sup>6</sup>.

O resfriamento, durante o processo de recristalização, deve ser feito lentamente para que se permita a disposição das moléculas em retículos cristalinos, com formação de cristais grandes e puros<sup>1</sup>.

#### 3.6.2. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

Primeiramente através de uma placa de vidro com aproximadamente 20cm por 20cm é fixada uma camada de sílica na qual contenha um pigmento revelador. Em seguida são aplicadas sobre a placa repetidas alíquotas (uma do lado da outra) da amostra a que se quer separar. Com a utilização de cubetas especiais, corre-se a placa de vidro com um solvente ou uma mistura de solventes apropriados, na qual ocorrerá a separação dos componentes, sendo que posteriormente aparecerá uma linha horizontal em cada parte da placa representando cada componente da amostra. Retira-se à parte revelada e depois por intermédio de alguma técnica de separação isola-se a sílica do composto e tem-se o composto livre da impureza (sílica)<sup>6</sup>.



### 3.7. ANÁLISE ESTRUTURAL

Entre as propriedades espectroscópicas de análise empregadas atualmente na determinação estrutural, a espectrometria de massas, a espectrometria de ultravioleta, no visível e no infravermelho, bem como a ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 constitui os mais amplamente empregados<sup>11</sup>.

A absorção molecular na região do UV e do visível do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado. Para muita das estruturas eletrônicas, esta absorção ocorre em uma porção pouco acessível do ultravioleta. Na prática, a espectrometria no ultravioleta é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados<sup>12</sup>.

A energia total de uma molécula é a soma de suas energias eletrônica, vibracional e rotacional. A magnitude destas energias decresce na ordem:  $E_{\text{elet}}$ ,  $E_{\text{vib}}$  e  $E_{\text{rot}}$ . A absorção de energia na região do ultravioleta produz modificações da energia eletrônica da molécula em consequência de transições dos elétrons de valência. Estas transições implicam a excitação de um elétron de um orbital molecular ocupado (um orbital p não ligante ou um orbital  $\pi$  ligante) ao primeiro orbital de energia superior (um orbital antiligante  $\pi^*$  ou  $\sigma^*$ ). O orbital antiligante é designado pelo asterisco. Assim, indica-se a transição de um elétron de um orbital ligante  $\pi$  para um orbital antiligante  $\pi^*$  por  $\pi \rightarrow \pi^*$ <sup>12</sup>.

Outra ferramenta na determinação da análise estrutural de um composto é o espectro de infravermelho que corresponde ao conjunto de bandas de absorção apresentadas pela amostra submetida à radiação infravermelha e estas bandas correspondem às mudanças na energia vibracional dos compostos orgânicos. A energia seletivamente absorvida da radiação IV provoca alterações transitórias nas ligações interatômicas, que podem sofrer estiramento axial ou deformações nos ângulos de ligação. Uma vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo de ligação, de forma a que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente. As vibrações de deformação angular correspondem a variações de ângulos de ligação, seja internamente em um conjunto de átomos, seja deste grupo de átomos em relação à molécula como um todo<sup>11</sup>.

Somente as vibrações que resultam em uma alteração do momento dipolar da molécula são observadas no infravermelho convencional. O campo elétrico alternado, produzido pela mudança de distribuição de carga que acompanha a vibração, acopla a vibração molecular com o campo magnético oscilante da radiação eletromagnética, o que resulta em absorção de energia radiante<sup>12</sup>.

O espectro de massas de uma substância pode fornecer importantes informações relacionadas com a sua estrutura, como a massa molecular e padrões de fragmentação. Outra informação retirada do espectro de massas é o pico base, sendo este o fragmento mais estável (a estabilidade depende do cátion formado). O espectrômetro de massas pode ser acoplado a um aparelho de cromatografia gasosa, que permite tanto a identificação como a quantificação de componentes de baixo peso molecular, mesmo em misturas complexas. Essa técnica é muito utilizada para a análise de óleos voláteis<sup>12</sup>.

A espectrometria de ressonância magnética nuclear é uma das ferramentas mais valiosas para a determinação estrutural de compostos orgânicos, contribuindo para o estabelecimento do esqueleto da molécula. Para a obtenção de espectros de ressonância, submete-se a amostra a um campo magnético externo, de forma que determinados núcleos de massa ímpar  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ , por exemplo, podem entrar em ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo, conforme sua vizinhança química. Os dados obtidos com esse método espectroscópico são muito importantes para a elucidação estrutural de praticamente toda as classes de produtos naturais, incluindo os metabólicos secundários vegetais. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  são os mais utilizados e a sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de H e C, em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à absorção de energia eletromagnética<sup>12</sup>.

Outra técnica na determinação estrutural é a utilização do CHN, onde fornecerá a porcentagem de carbono, nitrogênio e hidrogênio presente nas moléculas, ou seja, a fórmula elementar<sup>2</sup>.

Algumas constantes físicas, como a determinação da atividade óptica, cristalografia por raios X, ponto de fusão, podem ser necessárias para ajudar no estabelecimento de moléculas. Propriedades físico-químicas como espalhamento de luz, pressão osmótica e

medidas de viscosidade podem auxiliar na determinação do peso molecular de uma substância isolada<sup>7</sup>.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1. MATERIAL E MÉTODOS**

As separações cromatográficas foram feitas com Sílica-gel Merck de granulação 70-230 mesh (0,063-0,2 mm) Carlo Erba para a cromatografia em coluna. Para realização das análises por cromatografia em camada delgada foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel Merck com espessura de 0,2 mm. No processo de revelação das placas cromatográficas foi utilizada uma lâmpada de UV em comprimento de onda variando de 250 a 366 nm. Recorreu-se também a revelação em câmera de iodo, e/ou revelação com sulfato de cério seguido de aquecimento e/ou revelação com anisaldeído também seguido de aquecimento.

Os espectros de absorção na região do infravermelho, entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT 16PC utilizando-se pastilhas compactas de KBr de grau analítico.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram obtidos a 200 MHz em um espectrômetro Bruker AC 200, sendo os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais  $\delta$  (ppm) e tendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. As áreas relativas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades são descritas como: s (singlete), d (duplete), t (triplete), dd (duplo dublete) e m (multiplete). Como reagentes foi utilizado Acetona P.A (Nuclear), Metanol P.A (Nuclear), Hexano P.A (Nuclear), Acetato de Etila P.A (Nuclear), Clorofórmio P.A (Nuclear), Etanol P.A (Nuclear). Também foram utilizados no trabalho espátulas, provetas, tubos capilares de vidro, capela, uma balança analítica (Quimis), evaporador rotatório, balão de fundo redondo de 250 mL, béqueres, erlenmeyers.

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Microquímica APF-301 e não sofreram correções.

## 4.2. METODOLOGIA

Foi realizado um fracionamento cromatográfico das frações clorofórmio e aquosa obtida de um extrato bruto hidroalcoólico de *Polygala sp*, onde utilizou-se como procedimento de extração do material vegetal a maceração. O extrato clorofórmio foi submetido à cromatografia utilizando-se uma coluna sílica-gel com eluentes hexano e acetato de etila sob a forma de um gradiente crescente de polaridade. Para o extrato aquoso além dos dois eluentes citados acima recorreu-se a utilização de etanol.

## 4.3. MONITORAMENTO DAS FRAÇÕES CLOROFÓRMIO

Analísaram-se as frações da fase clorofórmio pré-obtidas de um extrato bruto hidroalcoólico de *Polygala sp* na qual realizou-se um monitoramento por cromatografia em camada delgada utilizando como eluente hexano: acetato de etila 2:1. As frações PC1 16-25, PC1 28-29, AM 28 e AM 22-25 foram reunidas conforme sua similaridade na ccd. Posteriormente às reuniões, estas foram solubilizadas em acetato de etila, adicionado-se aproximadamente 2g de carvão ativo e em seguida levadas à ebulição sob agitação por 5 minutos para obter o clareamento. Após foi realizada uma filtração simples e o filtrado novamente concentrado e submetido a um fracionamento por cromatografia em coluna sílica-gel.

### 4.3.1. Preparo da Pastilha

A massa de 1,5g obtida foi diluída com acetato de etila, e a ela acrescentada aproximadamente o dobro de sílica-gel para a realização da pastilha. Após foi evaporada até que estivesse bem seca (pastilha: fração + sílica).

### 4.3.2. Fracionamento das Frações Reunidas

Utilizou-se uma coluna de vidro de 30 cm de altura por 4,5 cm de diâmetro, recheada com 15 cm de sílica-gel na qual foi empacotada com hexano. A eluição da coluna foi realizada na forma de um gradiente crescente de polaridade utilizando misturas de hexano e acetato de etila. Iniciou-se com 100% de hexano, aumentando a polaridade da coluna com acetato de etila na proporção de 10 em 10% (Tabela 3). Recolheram-se 33 frações de 100mL que foram evaporadas no rotaevaporador e reunidas segundo o resultado das análises realizadas por cromatografia em camada delgada (Tabela 4). O monitoramento por CCD foi realizado em placas prontas de alumínio recortado no tamanho 1,5 cm por 3,0 cm e utilizando como fase móvel hexano e acetato de etila (70:30).

Tabela 3: Sistema de eluição utilizado no fracionamento das frações reunidas da fase clorofórmio.

<b>Hexano (%)</b>	<b>Acetato de Etila (%)</b>	<b>Frações coletadas</b>
100	00	–
90	10	–
80	20	1 a 19
70	30	20 a 26
60	40	27
50	50	28 e 29
40	60	–
30	70	–
20	80	–
10	90	30 e 31
00	100	32 e 33

Tabela 4: Reunião das frações obtidas na coluna do extrato clorofórmio.

Frações reunidas	Denominação
13 e 14	PS <sub>1</sub>
15 a 29	PS <sub>2</sub>
30 a 33	PS <sub>3</sub>

#### 4.3.3. Triagem das Frações Reunidas

A fração PS<sub>1</sub>, obtida da reunião das frações 13 e 14, que se apresentou na forma sólida, foi suspensa em metanol e filtrada para uma pré-lavagem do material sólido. Em seguida o sólido obtido foi redissolvido em acetona e deixado recrystalizar. Posteriormente monitorou-se novamente esta fração por cromatografia em camada delgada, utilizando como fase móvel hexano/acetato 2:1 e sulfato de cério como revelador.

Na fração PS<sub>2</sub>, obtida da reunião das frações 15 a 29, seguiu-se novamente a mesma rota feita para PS<sub>1</sub>.

A fração PS<sub>3</sub>, obtida da reunião das frações 30 a 33, apresentou-se como a fração mais polar do extrato contendo somente graxas, sendo que não foi possível retirar compostos desta.

### 4.4. PROCEDIMENTOS REALIZADOS NA FRAÇÃO AQUOSA DA *Polygala sp*

#### 4.4.1. Preparo da Pastilha

A massa de 1,6g obtida foi diluída com acetona e a ela acrescentada aproximadamente o dobro de sílica-gel para a realização da pastilha. Após foi evaporada até que estivesse bem seca.

#### 4.4.2. Fracionamento

A pastilha foi cromatografada utilizando uma coluna de 3,5 cm de diâmetro por 15 cm de altura, englobada com sílica-gel, utilizando-se hexano, acetato de etila e etanol sob a forma de um gradiente crescente de polaridade. Iniciou-se com 50% de hexano/acetato de etila, aumentando a polaridade até 100% de acetato de etila e posteriormente utilizou-se um gradiente de polaridade acetato de etila/etanol até a adição de 100% de etanol (Tabela 5). Foram coletadas frações de 100mL, evaporando o solvente no rotaevaporador, resultando em 41 frações. O monitoramento por CCD foi realizado em placas prontas de alumínio recortadas no tamanho 2,0 cm por 3,0 cm e utilizou-se como fase móvel acetato de etila/etanol (75:25). A reunião das frações obtida no extrato aquosa é mostrada abaixo (Tabela 6).

Tabela 5: Sistema de eluição utilizado no fracionamento da fração aquosa.

Hexano (%)	Acetato de Etila (%)	Etanol (%)	Frações coletadas
50	50	00	1 a 4
00	100	00	5 a 7
00	90	10	8 e 9
00	80	20	10 a 12
00	70	30	13 a 18
00	60	40	19 a 23
00	50	50	24 a 28
00	40	60	29 a 31
00	30	70	31 a 34
00	20	80	34 a 37
00	10	90	37 e 38
00	00	100	39 a 41

Tabela 6: Reunião das frações obtidas na coluna do extrato aquoso.

Frações reunidas	Denominação
01 a 07	Aq <sub>1</sub>
08 a 11	Aq <sub>2</sub>
12 a 18	Aq <sub>3</sub>
19 a 23	Aq <sub>4</sub>
24 a 29	Aq <sub>5</sub>
30 a 41	Aq <sub>6</sub>

#### 4.4.3. Triagem das Frações Aquosas Reunidas

Na fração Aq<sub>3</sub>, obtida da reunião das frações 12 a 18, que se apresentou como um sólido fino, foi realizada uma pré-purificação com acetato de etila. Em seguida o sólido obtido foi solubilizado com uma mistura de acetona/etanol (85:15) e deixou-se repousar para ocorrer uma boa recristalização. Posteriormente monitorou-se esta fração por cromatografia em camada delgada, utilizando-se como fase móvel acetato de etila/etanol 4:1 e sulfato de cério como revelador.

Na fração Aq<sub>4</sub>, obtida da reunião das frações 19 a 23, que se apresentou com um cristal em formato de agulhas, efetuou-se somente uma recristalização com acetona/etanol 2:1 com auxílio de um leve aquecimento. Em seguida realizou-se, por intermédio da cromatografia em camada delgada, o monitoramento do composto recristalizado utilizando-se como fase móvel acetato de etila/etanol 2:2 e anisaldeído como revelador.



## 4.5. Fluxograma

O fluxograma de todo processo de fracionamento da *Polygala sp* é mostrado abaixo (Figura 2).

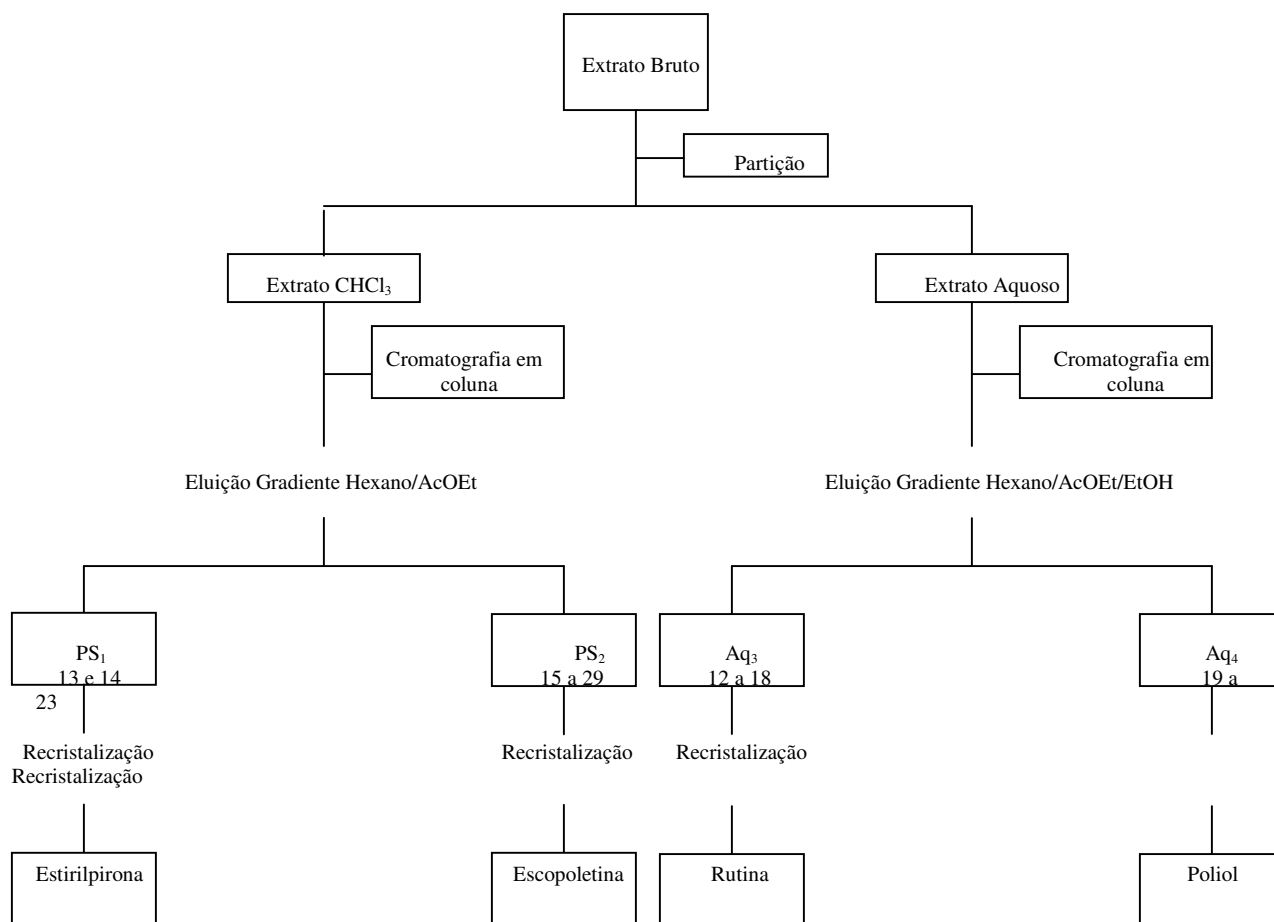


Figura 2: Fluxograma mostrando o fracionamento dos extratos da *Polygala sp*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO PS<sub>1</sub>

A fração PS<sub>1</sub> apresentou um composto sob forma de um sólido amarelo com ponto de fusão de 141°C a 144°C, sendo que na região do UV longo a fração apresentou uma coloração amarela.

O espectro na região do IV apresentou uma banda de absorção intenso em  $1706\text{ cm}^{-1}$  resultado de um estiramento  $\text{C}=\text{O}$  (o que pode ser atribuído a uma insaturação  $\alpha$ -carbonila de uma lactona) e uma deformação axial  $\text{C}-\text{H}$  em  $2950\text{ cm}^{-1}$  como principais bandas.

Na análise do RMN  $^1\text{H}$  percebeu-se a presença de dois singletes em  $\delta\ 3,78$  e  $\delta\ 3,76$ , atribuídos a dois grupos metoxila. Um detalhe importante é o aparecimento de um sinal singlete em  $\delta\ 5,9$  com integração para dois hidrogênios característico de um grupo metilenodioxido ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ). Notou-se também no espectro de RMN  $^1\text{H}$  dois singletes em  $\delta\ 6,6$  e  $\delta\ 6,5$  com um hidrogênio cada, sugerindo a presença de um grupo aromático tetrasubstituído com hidrogênios em relação *para*. O aparecimento de dois tripletes em  $\delta\ 2,86$  e  $\delta\ 2,82$ , com constantes de acoplamento de  $7,4\text{ Hz}$  sugere a presença de uma unidade etilênica que une dois sistemas insaturados (sob a influência de campos de desproteção anisotrópica de grupos aromáticos). Outros dois dubletes de bastante importância é revelado em  $\delta\ 5,5$  e  $\delta\ 5,45$ , com constante de acoplamento de  $1,9\text{ Hz}$ . Com os dados de RMN  $^1\text{H}$  chegou-se a proposição da estrutura de uma dihidroestirilpirona. Abaixo, na Figura 3, é representada a estrutura da dihidroestirilpirona. Esta estrutura foi confirmada pela comparação dos dados espectroscópicos<sup>13</sup> e dos Rf obtidos na CCD, em comparação com um padrão.

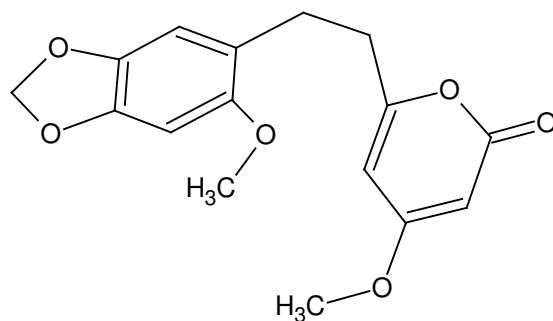


Figura 3: Estrutura do composto  $\text{PS}_1$  (dihidroestirilpirona).

## 5.2. IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO $\text{PS}_2$

O composto da fração  $\text{PS}_2$  se apresentou sob forma de um sólido amarelo pálido com ponto de fusão de  $200^\circ\text{C}$  e no UV longo a fração apresentou uma coloração azul fluorescente.

O espectro de absorção na região do IV apresentou três principais bandas de absorção, sendo uma intensa na região de  $3337\text{ cm}^{-1}$  que foi atribuída ao estiramento da ligação O-H, uma deformação axial C=O em  $1704\text{ cm}^{-1}$  e uma deformação axial de C—H em  $2980\text{ cm}^{-1}$ .

Analisando o espectro de infravermelho percebeu-se que a absorção em  $2980\text{ cm}^{-1}$  era bem pouco intensa o que nos permitiu deduzir a pouca quantidade de carbono ligado a hidrogênio. O pico em  $1704\text{ cm}^{-1}$  revela a presença de uma lactona  $\alpha$ - $\beta$  insaturada, sendo que a dupla ligação influencia em uma diminuição no número de onda da ligação C=O.

Os dados das análises espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  revelam a presença de um singlete em  $\delta\ 3,96$  com integração para três hidrogênios o que foi atribuído a uma metoxila. A presença de dois singletes em  $\delta\ 6,92$  e  $\delta\ 6,85$  com integração para um hidrogênio cada, sugere uma estrutura parcial onde temos um anel aromático tetrasubstituído com dois hidrogênios em relação *para*. Foi observado também dois dupletos centrados em  $\delta\ 7,61$  e  $\delta\ 6,27$ , com constantes de acoplamento de aproximadamente 9,5 Hz, sugerindo a presença de uma ligação dupla endocíclica conjugada a carbonila (o valor de 7,61 está de acordo com o hidrogênio localizado no campo de desproteção anisotrópico da carbonila), dado que vem em concordância com a frequência de estiramento na carbonila observada no espectro de IV. Comparando estes dados com os da literatura, esta estrutura foi identificada como sendo escopoletina, sendo que o ponto de fusão do composto constado na literatura é de  $204^\circ\text{C}^{14}$ . A confirmação foi realizada por comparação com os dados espectroscópicos<sup>15</sup> e com os Rf obtidos na cromatografia em camada delgada com um padrão de escopoletina. Na Figura 4 é mostrada a estrutura da escopoletina.

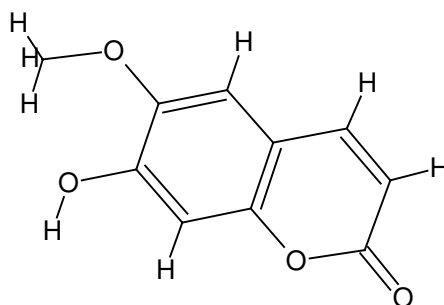


Figura 4: Estrutura do composto PS<sub>2</sub> (escopoletina).

### 5.3. IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO AQ<sub>3</sub>

Este composto se apresentou sob forma de um fino sólido amarelo com ponto de fusão de 198°C a 200°C.

O espectro na região do IV apresentou uma banda de absorção intensa e larga em 3302  $\text{cm}^{-1}$  resultado do estiramento das ligações O-H, estiramento C-H em 2973  $\text{cm}^{-1}$  e uma intensa banda de absorção em 1663  $\text{cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento de uma ligação C=O.

O espectro de infravermelho mostra uma banda em 1663  $\text{cm}^{-1}$ , sendo este devido a conjugação do grupo carbonila com uma ligação C=C resultando numa deslocalização dos elétrons  $\pi$  de ambos os grupos insaturados. A deslocalização dos elétrons  $\pi$  do grupo C=O reduz o caráter de ligação dupla carbono-oxigênio, causando absorção em menor número de ondas.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostra um perfil típico de flavonóide glicosilado onde a unidade glicosídica é uma rutinosídeo. Esta dedução é dada pela observação de um duplete em  $\delta$  1,0 característico do grupo metila da ramnose, pelo sinal em  $\delta$  5,7 devido ao próton anomérico da ramnose e os demais sinais na região de  $\delta$  3-4. Na região aromática do espectro de RMN  $^1\text{H}$  observa-se a presença de um par de dupletes centrados em  $\delta$  6,39 e em  $\delta$  6,58, com constantes de acoplamento  $J = 2$  Hz referentes aos dois hidrogênios *meta* do anel A.

No anel B são observados três hidrogênios: um com acoplamento *orto*,  $J = 8,25$  Hz, dando um dublete centrado em  $\delta$  7,05, um com acoplamento *meta*,  $J = 2,0$  Hz, fornecendo um dublete centrado em  $\delta$  8,05 e outro com acoplamento *orto* e *meta*,  $J = 8,2$  Hz e  $J = 2$  Hz respectivamente, dando um duplo dublete em  $\delta$  7,75. Também são observados uma série de sinais complexos na região de açúcares, indicando se tratar de um flavonoide glicosilado.

Com os dados do RMN  $^1\text{H}$ , infravermelho, informações da literatura<sup>16</sup> e posterior comparação com o padrão chegou-se à estrutura da rutina, a qual está apresentada abaixo (Figura 5). Abaixo, na Figura 6, é mostrada uma comparação do Rf entre o composto isolado e um padrão de rutina, utilizando-se uma placa de CCD revelada com anisaldeído.

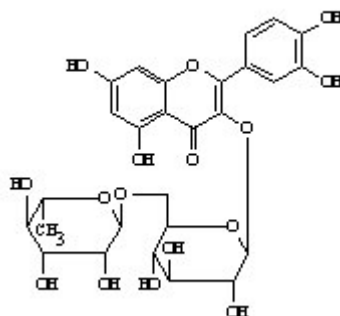


Figura 5: Estrutura do composto Aq<sub>3</sub> (rutina).



Figura 6: CCD do composto isolado e padrão de rutina.

#### 5.4. IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO AQ<sub>4</sub>

O composto se apresentou sob forma de um sólido incolor com cristais em formas de agulhas.

Uma característica importante é a questão da solubilidade, onde somente em solventes altamente polares o composto apresentou uma solubilidade considerável (até mesmo em etanol o composto é de difícil solubilização).

O espectro na região do IV apresentou uma banda de absorção muito intensa e larga em  $3400\text{ cm}^{-1}$  sugerindo a presença de vários grupos OH.

Com o intuito de verificarmos se o composto em questão teria a capacidade de se oxidar, efetuou-se duas reações importantes dentro da química orgânica: o ensaio de Tollens e a formação de acetal. No primeiro caso procedeu-se a reação de oxidação do composto com  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$  a  $60^\circ\text{C}^{17}$  (embora este íon seja um oxidante fraco), resultando na deposição de prata metálica nas paredes do tubo de ensaio e conseqüente oxidação do

composto. A formação do acetal foi realizada colocando o composto em refluxo com acetaldeído por 1 hora usando sulfato de cobre como catalisador<sup>17</sup>. A análise por cromatografia em camada delgada, utilizando como fase móvel acetato de etila/etanol 70:30 e anisaldeído como revelador, revelou que o composto reagiu, mostrando o produto da reação com índice de retenção maior, o que está de acordo com a diminuição da polaridade de um poliol pela formação do acetal correspondente.

## 6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico realizado com extratos de *Polygala sp.*, utilizando-se como base à fração clorofórmio e aquosa, permitiu o isolamento e identificação de quatro compostos: escopoletina, estirilpirona, rutina e um poliol. Os compostos tiveram suas estruturas propostas a partir de dados espectroscópicos e por comparação com dados da literatura de compostos modelos.

A confirmação da estrutura do poliol isolado requer uma investigação a mais, como a utilização de outras transformações químicas, e um estudo espectroscópico mais detalhado.

As técnicas fitoquímicas, tais como a cromatografia e a espectroscopia utilizadas no isolamento e identificação dos compostos foram bem desenvolvidas e contribuíram para uma boa aprendizagem na área de produtos naturais.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Simões, C.M.O., Schekel, E.P., Gosman, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 2ª edição, Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000.
2. Barreiro, E.J., Fraga, C.A.M., *Química Medicinal – As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, Ed. Artmed Ltda, Rio de Janeiro, 2001.
3. Ansel, H.C., Popovich, N.C., Allen, L.V., *Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*, 6ª ed., Ed. Premier, 2000.
4. Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S., *Introdução a Métodos Cromatográficos*, 4ª ed. revisada e ampl., Ed. da Unicamp, Campinas, 1990.
5. Oliveira, F., Akisue G., Akisue, M.K., *Farmacognosia*, 1ª ed., Ed. Atheneu, 1998.
6. Ugaz, O. L., *Investigación Fitoquímica - Métodos en el Estudio de Productos Naturales*, 1ª ed., Ed. Fondo editorial, Peru, 1988.
7. Costa, A.F., *Farmacognosia*, 3ª ed., Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2000.
8. Apostila de Química Orgânica Experimental-1, Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/organica>>, Acesso em: agosto/2004.
9. Skoog, D.A., *Principles of Instrumental Analysis*, 4<sup>th</sup> ed., 1992.
10. Ewing, G.W., *Métodos Instrumentais de Análise Química*, Volume II, Ed. Edgard Blücher LTDA, Ed. da Universidade de São Paulo, 1972.
11. Allinger, N.L., *Química Orgânica*, 2ª ed., Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1978.
12. Silverstein, M.R., Webster, F. X., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 6ª edição, Ed. Guanabara, 2001.
13. Pizzolatti, M.G., Luciano, C., Monache, F.D., *Styryl-and dihydrostyryl-2-pyrones derivatives from Polygala sabulosa*, *Phytochemistry* 55, 819, 2000.
14. Dictionary of Natural Products.
15. Silva, W.P.K, *et al.*, *Isolation of scopoletin from leaves of Hevea brasiliensis and the effect of scopoletin on pathogens of H. brasiliensis*, *Mycopathologia* 153, 199-202, 2001
16. Buszewski, B., Kawka, S., Suprynowicz, Z., Wolski, T., *Simultaneous isolation of*

*Rutin and Esculin from plant material and drugs using solid-phase extraction*, Journal of

Pharmaceutial and Biomedical Analysis 11, 211-215, 1993.

17. Vogel, A. I. A., *Textbook of Practical Organic Chemistry*; 3<sup>rd</sup> ed; Longmann, Londres, 1978.